



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification:</b> A61K 9/00, A61K 31/485, A61K 31/70, A61K 38/33, A61K 47/24, A61K 47/26, A61P 25/04	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 00/33810</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 15 June 2000 (15.06.2000)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/FR99/03060 <b>(22) International Filing Date:</b> 08 December 1999 (08.12.1999) <b>(30) Priority Data:</b> 98/15534 09 December 1998 (09.12.1998) FR <b>(60) Parent Application or Grant</b> BIOVECTOR THERAPEUTICS (S.A.) [/]; (). BETBEDER, Didier [/]; (). SPERANDIO, Sandrine [/]; (). BETBEDER, Didier [/]; (). SPERANDIO, Sandrine [/]; (). BREESE, Pierre; ().		<b>Published</b>
<b>(54) Title: USE OF VITAMIN B12 IN A NASAL COMPOSITION FOR DELIVERING ACTIVE AGENTS TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM</b> <b>(54) Titre: UTILISATION DE VITAMINE B12 DANS UNE COMPOSITION NASALE POUR LA DELIVRANCE D'AGENTS ACTIFS AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>		
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns the use of vitamin B12 in a pharmaceutical composition to be administered by nasal pathway, to provide and/or increase the passage for an active agent, present in said composition to the CNS. The invention also concerns pharmaceutical compositions for nasal administration of active agents to the CNS, and the method for preparing them.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne l'utilisation de vitamine B12 dans une composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale, pour obtenir et/ou augmenter le passage d'un agent actif, présent dans ladite composition jusqu'au SNC. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques pour l'administration par voie nasale d'agents actifs à délivrer au SNC, ainsi que leur procédé de préparation.</p>		

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



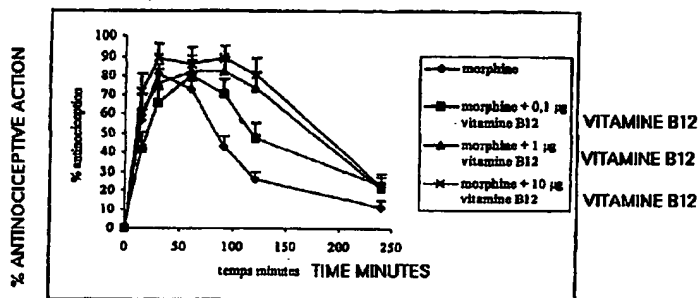
DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : A61K 9/00, 47/26, 47/24, 31/70, 31/485, 38/33, A61P 25/04 // (A61K 38/33, 31:70) (A61K 31/70, 31:485)	A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/33810</b> (43) Date de publication internationale: 15 juin 2000 (15.06.00)
--	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/03060 (22) Date de dépôt international: 8 décembre 1999 (08.12.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/15534 9 décembre 1998 (09.12.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOVECTOR THERAPEUTICS (S.A.) [FR/FR]; Chemin du Chêne Vert, Boite postale 169, F-31676 Labège Cedex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BIETBEDER, Didier [FR/FR]; 16, place de la Peupleraie, F-31140 Aucamville (FR). SPERANDIO, Sandrine [FR/FR]; 27, rue de Bougainville, F-31400 Toulouse (FR). (74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: USE OF VITAMIN B12 IN A NASAL COMPOSITION FOR DELIVERING ACTIVE AGENTS TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

(54) Titre: UTILISATION DE VITAMINE B12 DANS UNE COMPOSITION NASALE POUR LA DELIVRANCE D'AGENTS ACTIFS AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL



(57) Abstract

The invention concerns the use of vitamin B12 in a pharmaceutical composition to be administered by nasal pathway, to provide and/or increase the passage for an active agent, present in said composition to the CNS. The invention also concerns pharmaceutical compositions for nasal administration of active agents to the CNS, and the method for preparing them.

(57) Abrégé

La présente invention concerne l'utilisation de vitamine B12 dans une composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale, pour obtenir et/ou augmenter le passage d'un agent actif, présent dans ladite composition jusqu'au SNC. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques pour l'administration par voie nasale d'agents actifs à délivrer au SNC, ainsi que leur procédé de préparation.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Description

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

**UTILISATION DE VITAMINE B12 DANS UNE COMPOSITION NASALE POUR LA DELIVRANCE D'AGENTS ACTIFS AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL**

10

5

La présente invention concerne le domaine du traitement et du diagnostic des maladies du système nerveux central, et s'intéresse plus particulièrement au passage et à la délivrance d'agents actifs thérapeutiques ou de diagnostic au niveau du système nerveux central.

15

10

Alors que le cancer et les problèmes cardio-vasculaires sont les principales causes de mortalité dans les pays développés, les maladies liées au système nerveux sont parmi les premiers facteurs qui exposent les populations à des problèmes de santé (morbidity). Les progrès en biologie et en neurologie ont toutefois des difficultés à se concrétiser sous forme de nouveaux outils de diagnostic et de thérapeutique du système nerveux central (SNC), notamment parce qu'il sont particulièrement difficiles à administrer de manière efficace.

20

15

25

20

Il n'y a en effet pas de diffusion des substances et des nutriments depuis les capillaires sanguins au niveau de la moelle épinière et du cerveau comme au niveau des autres organes. Les échanges sont limités au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et du plexus choroïde, où se forme le liquide céphalo rachidien (LCR). Celui-ci apporte les nutriments, les hormones et les leucocytes aux cellules du SNC. La BHE contrôle strictement la composition du milieu extracellulaire des neurones en limitant l'entrée de la plupart des substances présentes dans le sang et en en rejetant d'autres.

30

25

35

40

45

35

La délivrance de substances exogènes au SNC ne peut se faire par les voies systémiques conventionnelles de la thérapeutique, à l'exception des composés extrêmement lipophiles de faible poids moléculaire ou de composés susceptibles d'un transport sélectif lié à la présence d'un transporteur ou à des phénomènes d'endocytose (Ikumi Tamai et al. Drug Delivery through the BBB, (1996) Advanced Drug Delivery Reviews 19:401-424). La plupart des médicaments utilisés en neuropsychiatrie à l'heure actuelle comme par

50

55

5

2

10

5

15

10

20

15

25

20

30

35

exemple la codéine, les benzodiazépines, la phénytoïne, etc... sont des produits pharmaceutiques liposolubles qui traversent la BHE après administration orale (Oldendorf, W.H. Lipid solubility and drug penetration of the Blood-Brain-barrier (1974) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147:813-816). L'entrée du glucose et de l'acide lactique, qui sont des substances polaires, ou de la L-Dopa (Nutt, J.G. et al. The "on-off" phenomenon in parkinson's disease. Relation to levodopa absorption and transport. (1984) N. Engl. J. Med. 310:483-488), aminoacide neutre servant au traitement de la maladie de Parkinson, sont liées à des transporteurs spécifiques. Certains transporteurs, comme la glycoprotéine-P, sont bidirectionnels (Knudsen, G.M. et al. Kinetic analysis of the human BBB transport of lactate and its influence by hypercapnia. (1991) Cerebral Blood Flow Metab. 11:581-586) et limitent l'entrée de drogues vers le cerveau.

La BHE exclut en particulier l'entrée des protéines et d'un grand nombre de peptides du plasma, à tel point que le fluide interstitiel du cerveau contient moins de 0,5% des protéines plasmatiques. Ainsi, les travaux réalisés en neurobiotechnologie sur de nombreux composés hydrophiles et/ou à haut poids moléculaire ayant un très fort potentiel en thérapeutique comme les peptides, les canaux ioniques, les récepteurs neuronaux, les facteurs neurotrophiques et les déterminants génétiques sont à ce jour limités dans leurs applications médicales du fait de leur difficulté d'administration au SNC comme xénobiotiques.

40

30

45

35

50

Pour pallier ces inconvénients, il a été proposé de rendre liposoluble une molécule donnée par transformation chimique (lipidisation). La lipidisation est utilisée pour la fabrication de pro-drogues, analogues liposolubles de composés pharmacologiques hydrophiles capables de traverser les membranes biologiques. Toutefois, la BHE refoule vers le sang ce type de composé et leur demi-vie est extrêmement courte. Pour cela, on développe en parallèle des systèmes de séquestration tissulaires, voire d'inhibition de la glycoprotéine-P (Ikumi Tamai et al. Drug Delivery through the BBB, (1996) Advanced Drug Delivery Reviews 19:401-424).

55

5

3

10

5

15

10

20

15

25

20

30

35

40

30

45

35

50

55

Les modifications chimiques apportées à la molécule sont délicates et peuvent compromettre l'affinité au récepteur responsable de l'activité biologique. La lipidisation n'est utilisable que pour les molécules de poids moléculaire relativement faible (inférieur à 1.000, voire 600-800) soit au mieux les tetra- peptides et penta-peptides (Pardridge, W.M. Peptide lipidization and liposomes. In Peptide Drug Delivery to the Brain pp 129-140 (1991) Raven Press, New York).

Les liposomes de petite taille (25-50 nm) pourraient présenter un intérêt pour la délivrance de produits biologiquement actifs au niveau central. Mais les liposomes de taille plus élevée (0,3-2 µm) sont piégés dans l'espace vasculaire cérébral et présentent donc des risques d'embolie. Toutefois, les liposomes sont instables dans le cerveau, notamment à cause de la présence de l'enzyme lecithine-transférase au niveau des membranes neuronales et des cellules gliales (Pardridge, W.M. Peptide lipidization and liposomes. In Peptide Drug Delivery to the Brain pp 140-148 (1991) Raven Press, New York).

Par ailleurs, des implants intracérébro-ventriculaires de plusieurs types sont en cours d'expérimentation comme :

- un implant de cellules génétiquement modifiées pour l'expression de facteurs protéiques, encapsulées dans une fibre creuse (BioWorld Today, American Health Consultants Vol 8 35 : 1,4, 1997),

- une micro-pompe chargée de drogue pour quelques mois (Winn, S.R. et al. Polymer-encapsulated cells genetically modified to secrete human nerve growth factor promote the survival of axotomized septal cholinergic functions. PNAS (1994) Vol 91:2324-2328), ou

- des formulations à relargage contrôlé utilisant des lipides, où les drogues sont encapsulées dans des microvésicules structurées en éponge (Chatelut E. et al Sustained-release methotrexate for intracavitary chemotherapy. J. Pharm. Sc (1994) Vol 83, 3: 429-432).

5

4

Mais ce type d'administration est extrêmement lourd d'application car il implique une intervention chirurgicale.

10

5

15

10

20

15

Des formulations de substances actives qui pénétreraient le SNC sans avoir à être implantées sont recherchées, notamment en exploitant les transporteurs endogènes de la BHE. Ces transporteurs comportent des récepteurs membranaires qui, en présence de leur ligand, sont internalisés par la cellule endothéliale. Les vésicules contenant le ligand migrent vers la paroi abluminale et sont relarguées vers le tissu nerveux. Ceci peut être obtenu, par exemple, par fusion de la protéine active avec une protéine ayant un récepteur cellulaire au niveau central, comme décrit dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le numéro WO95/02421.

25

20

30

25

35

D'autres études récentes ont montré le passage d'un hexapeptide, la dalargine, à travers la BHE de souris, après administration intraveineuse d'une formulation dans des nanoparticules (230 nm) de butyl-cyanoacrylate, pourvu que ces particules soient recouvertes de surfactant, le polysorbate 80. Ces particules chargées de peptide pénétreraient par phagocytose ou endocytose. Dans cette expérience, le peptide doit être associé aux nanoparticules, l'injection d'un simple mélange contenant la drogue, les microparticules et le surfactant ne provoque aucun effet biologique (Kreuter, J. et al Passage of peptides through the BBB with colloidal polymer particles Brain Research (1995) 674: 171-174).

40

30

45

35

50

La première administration d'un peptide recombinant au niveau du SNC a été réalisée par infusion intra-cérébroventriculaire, directement dans le LCR. Cette méthode permet une délivrance à des concentrations thérapeutiques et à proximité des parois ventriculaires, le LCR ne pénétrant pas dans le parenchyme cérébral (Pardridge, W.M. Transnasal and ventricular delivery of drugs. In Peptide Drug Delivery to the Brain pp 109-122 (1991) Raven Press, New York). Ce type d'administration, invasif et extrêmement délicat d'utilisation, a été utilisé pour administrer par exemple du méthotrexate pour traiter la

55

5

5

leucémie méningéome, de la pénicilline pour la méningite bactérienne, des immunoglobulines pour la méningite virale et la morphine contre la douleur chronique.

10

5

15

10

20

Les fosses nasales représentent une voie naturelle d'administration de substances actives qui offre de nombreux avantages potentiels dont la surface relative de la muqueuse nasale, l'épithélium richement vascularisé, la perméabilité aux substances lipophiles et la relative perméabilité aux hydrophiles. De plus, l'irrigation sanguine de cette muqueuse, liée à la circulation pulmonaire, évite le foie (Harris, A.S. Review : Clinical opportunities provided by the nasal administration of peptides. Journal of Drug targeting Vol.1, pp 101-116 (1993)).

15

25

20

30

Les cellules constituant l'épithélium de la muqueuse nasale sont jointes par des jonctions serrées (tight junctions), qui limitent le passage de molécules entre la lumière de la cavité et les vaisseaux sanguins. Par contre, le pôle basal des cellules neurosensorielles olfactives de l'épithélium nasal s'allonge en un axone qui se termine dans le bulbe olfactif du cerveau. Cet axone traverse la membrane basale de la muqueuse et l'espace submucosal. La voie neuronale olfactive pourrait ainsi constituer une porte d'entrée vers le cerveau.

35

25

40

30

De plus, l'espace sous-arachnoïdien se prolonge au niveau des axones des cellules neuro-sensorielles en des digitations qui viennent au contact de la sous-muqueuse nasale. Il y a donc un flux de LCR provenant du lobe olfactif vers l'espace sous mucosal. L'anatomie particulière de la muqueuse nasale confère donc un voisinage inhabituel avec le LCR.

45

35

Par ailleurs, dès la fin du 19ème siècle, des chercheurs avaient postulé que le nerf olfactif pouvait permettre le transport de substances traçantes et d'organismes divers de la muqueuse nasale au bulbe olfactif et au CNS.

50

En 1970 De Lorenzo (De Lorenzo Taste and Smell in vertebrates J & A Churchill ltd (1970), 151-176) a administré par voie intranasale des particules d'or chez le

55

5

6

singe et estimé la vitesse de progression entre le nez et le bulbe olfactif à 2,5mm/h.

10

5

En 1971, Kristensson & Al (Kristensson & Al Acta Neuropathol. (1971),19,145-154 ) ont démontré que si des méthodes sensibles sont utilisées pour tracer des substances macromoléculaires comme la peroxydase de raifort et l'albumine , on observait un mouvement de la muqueuse nasale vers l'espace subarachnoïde.

15

10

20

15

25

20

30

Plus tard Pardridge (Partridge Peptide drug delivery to the brain Raven Press (1991), 101), dans son livre sur la délivrance des peptides au cerveau énonce que l'administration nasale de substances hautement liposolubles, telle la progestérone permet d'atteindre directement le fluide cérébrospinal sans entrer dans le compartiment sanguin périphérique. La biodisponibilité de la progestérone étant plus grande après insufflation nasale qu'après infusion intraveineuse. Les peptides, substances hautement hydrophiles pénètrent les barrières de diffusion membranaires entre le nez et l'espace subarachnoïde olfactif à des vitesses considérablement plus faibles que la progestérone.

35

25

La demande de brevet PCT publiée sous le numéro WO91/07947 décrit des compositions pharmaceutiques pour l'administration nasale de substances actives qui empruntent cette voie neuronale. Les compositions associent le produit biologiquement actif à un transporteur capable d'induire l'absorption, la drogue subirait alors un transport neuronal rétrograde et/ou antérograde.

40

30

Sakane (Sakane & Al S.T.P. Pharma Sciences (1997),7,(1),98-106) a publié récemment une étude systématique sur le transport direct de la cavité nasale au fluide cérébrospinal :

45

35

- l'étude de la céphalexine, antibiotique hydrophile, montre clairement un transport direct de la cavité nasale au fluide cérébro-spinal.

50

- l'étude de différents sulfonamides à lipophilie variable montre que le transport est dépendant de la lipophilie et de la fraction non ionisée du principe actif.

55

5

7

- l'étude de dextrans de différents poids moléculaires a montré que les principes actifs pouvaient être transportés jusqu'à 20KDa de poids moléculaire.

10

5

- enfin une étude du transport des peptides a été réalisée. La molécule choisie est un oligopeptide analogue de l'enképhaline: la (D-Ala 2)-Méthionine enképhalinamide, elle est détectée dans le liquide cérébrospinal après administration nasale et sa concentration est augmentée par l'utilisation d'un promoteur d'absorption : le glycocholate de sodium et par des inhibiteurs de protéases : la puromycine (inhibiteur de l'aminopeptidase) et le thiorphan (inhibiteur de l'enképhalinase).

15

10

20

15

Cependant, malgré des méthodes d'instillation nasale chez le rat, visant à limiter au maximum la fuite du produit dans le pharynx, les quantités de peptide obtenues dans le fluide cérébrospinal sont très faibles, même en présence d'un promoteur d'absorption ou d'inhibiteurs de protéases (de l'ordre de la centaine de ng/ml), ne permettant pas un effet thérapeutique.

25

20

30

La demanderesse a maintenant découvert que la vitamine B12 est capable d'activer le passage de substances hydrophiles vers le système nerveux central (SNC).

35

25

La vitamine B12 est le nom généralement utilisé pour l'ensemble des cobalamines. Cyanocobalamine et hydroxocobalamine sont les formes principales en utilisation clinique. Les préparations de vitamine B12 sont utilisées principalement dans le traitement et la prévention des déficiences en B12. Elles sont généralement administrées par voie intramusculaire, à des doses de 250 à 1000 µg en début de traitement.

40

30

45

35

Afin de pallier aux inconvénients de ce mode d'administration, on a proposé dans l'art antérieur l'administration par voie nasale de vitamine B12 (Van Asselt D.Z. dans Br. J. Clin. Pharmacol. (1998), 45, 1, p. 83-6 ; Slot W.B. dans Gastroenterology (1997), 113, 2, p. 430). Ces travaux rapportent que l'absorption nasale d'hydroxocobalamine est rapide, forte et bien tolérée et qu'elle conduit à une augmentation importante de cobalamine

50

55

dans le plasma. L'administration de vitamine B12 par voie nasale à des doses de 50 à 1000 µg par spray pour le traitement des déficiences a aussi été décrit dans les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les No. WO86/05987 et WO86/05988.

La vitamine B12 est également connue pour ses propriétés antalgiques. En combinaison avec d'autres vitamines B (B1, B6), par voie injectable, elle contribue à l'effet antinociceptif de l'ensemble, cet effet étant largement dû à la B6. (Jurna I. dans Klin. Wochenschr. 1990, 68, 2, p.129-35).

Le brevet Canadien No. 2 034 576 rapporte l'utilisation de vitamine B12 seule, chez l'homme comme analgésique et pour réduire ou prévenir l'inflammation, à de très fortes doses, comprises entre 5-100 mg/j.

Par ailleurs, la demande de brevet européen No. 108 017 décrit l'utilisation de vitamine B12 en association avec des analgésiques centraux du type morphine ou ses dérivés. Dans ce cas, ce sont ses propres propriétés antalgiques qui sont recherchées dans le but de permettre la réduction de 2 à 4 fois de la dose de morphine utilisée afin d'en réduire les effets indésirables. Ainsi, dans les solutés injectables décrits, les quantités de B12 ou analogues utilisées sont de l'ordre du mg ou de la dizaine de mg.

Afin d'évaluer les propriétés de la vitamine B12 sur le passage du nez au cerveau de substances actives, plusieurs drogues d'intérêt central antinociceptif ont été étudiées : la buprénorphine, le DAGO et la morphine. Les composés de type opiacé qui ont été testés sont des molécules de faible poids moléculaire, entre 50 et 10 000, relativement hydrosolubles à l'exception de la buprénorphine.

Leur passage au niveau du SNC est mesuré par leur activité antinociceptive. Les opiacés produisent leurs effets par l'interaction avec trois types de récepteurs : mu, delta et kappa. Les composés choisis, dont notamment les dérivés de l'enképhaline endogène, ont une action spécifique

sur les récepteurs mu des opiacés (Pasternak G. W. et al Morphine-6-glucuronide, a potent mu agonist, Life Sci. 41 : 2845-2849, (1987) ; Kosterlitz H.W., et al. Br. J. Pharmacol 73, 299 (1981)). Ces récepteurs baignent dans le LCR, par conséquent l'observation d'une activité biologique indique le passage de la substance jusqu'à ce niveau. Ces composés sont facilement dégradés et ont peu de chances d'atteindre le cerveau par voie systémique lorsqu'ils sont administrés à faible dose.

Le DAGO est un pentapeptide de formule :

Tyr, D-Ala, Gly, N-Me-Phe, Gly-ol, et de poids moléculaire de 513. Il est un analogue de l'extrémité amino terminale de la bêta endorphine, connu pour être plus résistant aux protéases que l'enképhaline endogène.

La morphine est le prototype de l'analgésique et narcotique de type opiacé, principal alcaloïde de l'opium. Utilisée sous forme de chlorhydrate, son poids moléculaire est de 376. Dans les applications médicales, elle peut être administrée par voie parentérale pour les douleurs postopératoires et par voie orale pour les douleurs liées au cancer.

La buprénorphine est une oripavine, plus lipophile que la morphine, dérivée de la thébaine. Utilisée sous forme de chlorhydrate, sa masse molaire est de 467. C'est un analgésique puissant, 25 à 50 fois plus que la morphine, qui est douée d'une activité agoniste-antagoniste partielle des récepteurs opiacés. Elle est utilisée dans le traitement des douleurs aiguës ou chroniques par administration parentérale ou sublinguale.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention avec ces composés ont permis de mettre en évidence de nouvelles propriétés de la vitamine B12 comme activateur du passage d'agents actifs du nez au système nerveux central. Plus particulièrement, la vitamine B12 présentent les propriétés suivantes :

- Elle permet le passage du nez au cerveau de substances actives à des doses où la substance seule n'est pas active par administration nasale.

5

10

- Elle permet d'augmenter l'effet d'une dose de substance active par administration nasale comparativement à la drogue seule administrée par la même voie

10

5

- Elle prolonge la durée d'action de la substance active administrée par voie nasale lorsque cette substance seule est déjà active par cette voie.

15

10

Ces observations tendent à faire penser que la vitamine B12 n'agit pas par simple effet passif mais qu'elle induit un phénomène actif responsable de la pénétration de la substance. En effet, la vitamine B12, utilisée seule aux doses de 0,1 à 10 µg n'induit aucune activité antinociceptive. On est donc très loin des doses massives qu'il faut administrer pour obtenir une activité analgésique.

20

15

25

Les travaux réalisés par la Demanderesse suggèrent que la vitamine B12 interagit avec la muqueuse nasale en favorisant le passage direct nez-LCR. Toutefois, un passage du nez au sang puis du sang au cerveau à travers la BHE n'est pas à exclure au moins comme une des composantes des effets observés.

20

30

25

35

En conséquence, l'invention concerne l'utilisation de vitamine B12, dans une composition pharmaceutique aqueuse administrée par voie nasale chez un sujet humain ou animal, pour obtenir et/ou augmenter le passage d'un agent actif présent dans ladite composition au niveau du SNC.

40

30

La nouvelle utilisation selon l'invention, est remarquable en ce que la vitamine B12 permet d'obtenir et/ou de favoriser le passage du nez au SNC de substances actives pour le diagnostic ou le traitement d'une affection du SNC, et plus particulièrement de petites molécules et/ou de molécules fragiles comme les peptides ou protéines.

45

35

L'obtention et/ou l'augmentation du passage d'un agent actif administré par voie nasale jusqu'au SNC se traduit dans le cas où l'agent actif est une substance pharmacologiquement active au niveau du SNC par l'obtention et/ou l'augmentation de l'efficacité de ladite substance.

50

De façon tout à fait surprenante, la demanderesse a constaté que l'administration nasale de

55

substances actives au niveau du SNC en présence de vitamine B12 à des doses infraliminales permet d'obtenir une augmentation de la durée d'action de la substance active et de son intensité.

Les doses de vitamine B12 utilisées sont très faibles par rapport à celles de l'agent actif, et l'administration décalée des vitamine B12 et de l'agent actif dans le même rapport de dose permet d'obtenir le même effet.

Plus particulièrement, la demanderesse a défini que la quantité, en poids, de vitamine B12 dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale selon l'invention est inférieure et avantageusement très inférieure, en poids, à la quantité d'agent actif. Ainsi dans l'utilisation selon l'invention, la quantité de vitamine B12 dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale, est comprise entre 1 µg et 1 mg.

L'invention concerne donc aussi l'utilisation d'une composition aqueuse comprenant de la vitamine B12 avantageusement à la dose indiquée ci-dessus, et au moins un agent actif, pour la préparation d'un médicament pour administration nasale à utiliser en diagnostic ou thérapie d'une affection du SNC chez un sujet humain ou animal.

Selon la nature et les propriétés de l'agent actif, l'invention concerne tant le domaine du diagnostic que ceux du traitement et de la prévention d'une affection du SNC.

A titre, d'agent thérapeutique, on peut citer ceux choisis parmi : les analgésiques, anesthésiques, antalgiques, antispasmodiques, antiparkinsoniens, antiépileptiques, antimigraineux, ou tout autre agent utile dans le traitement des maladies neurodégénératives, psychiatriques ou du trouble du comportement, anticancéreux, antiviraux, antiprions, antibiotiques, ou encore des agents actifs comme des facteurs de croissance, des acides nucléiques, des vitamines, des hormones, etc....

A titre, d'agent de diagnostic, on peut citer ceux choisis parmi : les anticorps et molécules permettant de cibler des récepteurs du CNS, les agents d'imagerie médicale utilisés en IRM, scintigraphie, PET, ultrason.

La vitamine B12 utilisée pour l'administration par voie nasale selon l'invention, peut être présentée dans un médicament contenant ou non également l'agent actif. Dans le cas où le médicament contenant la vitamine B12 ne contient pas aussi l'agent actif, on peut envisager une administration par voie nasale différée de la vitamine B12 et du (ou des) agent(s) actif(s), dans un ordre ou dans l'autre.

Dans l'utilisation selon l'invention, la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale peut contenir également tout véhicule pharmaceutiquement compatible avec la vitamine B12 et/ou l'agent actif, ainsi que éventuellement un agent de perméabilisation de la muqueuse nasale.

L'invention concerne donc aussi une composition pharmaceutique aqueuse pour l'administration nasale d'au moins un agent actif à délivrer au SNC, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un agent actif et de la vitamine B12.

La composition pharmaceutique selon l'invention est remarquable en ce qu'elle permet d'obtenir et/ou d'augmenter le passage de l'agent actif administré par voie nasale jusqu'au SNC.

L'obtention et/ou l'augmentation du passage d'un agent actif administré par voie nasale jusqu'au SNC se traduit dans le cas où l'agent actif est une substance pharmacologiquement active au niveau du SNC par l'obtention et/ou l'augmentation de l'efficacité de ladite substance, administrée par voie nasale, au niveau du SNC.

Dans la composition de l'invention, les agents actifs sont simplement mélangés avec la vitamine B12. La quantité de vitamine B12 dans la composition pharmaceutique selon l'invention est inférieure et avantageusement très inférieure, en poids à la quantité d'agent actif.

5

On préfère tout particulièrement utiliser une dose de vitamine B12, dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale selon l'invention, comprise entre environ 1 µg et 1 mg.

10

5

Cette dose de vitamine B12 est très largement inférieure de celle décrite dans l'art antérieur pour l'utilisation de la vitamine B12.

15

10

Comme indiqué précédemment, la vitamine B12 utilisée pour l'administration par voie nasale selon l'invention, peut être présentée dans une composition pharmaceutique contenant ou non également l'agent actif. Ainsi, l'administration nasale de vitamine B12 et du ou des agents actifs peut être réalisée grâce aux compositions précédentes comprenant ces deux composants, ou consister en en la prise successive de l'un puis de l'autre de ces constituants, chacun présenté dans une composition pharmaceutique séparée, à des doses respectives conformes aux doses indiquées précédemment pour une composition contenant les deux composants.

20

15

25

20

30

L'invention concerne donc également une composition pharmaceutique contenant comme substance active uniquement la vitamine B12 à la dose définie ci-dessus, l'agent actif à délivrer au niveau du SNC étant lui contenu dans une composition contenant ou non de la vitamine B12. L'invention se rapporte donc à une trousse pharmaceutique comprenant :

35

25

40

30

- une première composition comprenant de la vitamine B12 avantageusement associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible avec la vitamine B12,

45

35

- une seconde composition comprenant au moins un agent actif associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible avec ledit agent actif,

50

Une forme d'utilisation, particulière de cette trousse pharmaceutique, consiste à regrouper les deux compositions sur un applicateur nasal commun de façon à délivrer simultanément lesdites deux compositions. Dans le cas d'une administration successive des deux compositions,

55

l'administration nasale de la vitamine B12 peut être effectuée avant ou après l'administration nasale du ou des agents actifs.

La composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale de l'invention peut bien entendu contenir également tout véhicule pharmaceutiquement compatible avec la vitamine B12 et/ou l'agent actif, ainsi qu'éventuellement un agent de perméabilisation de la muqueuse nasale. Ces compositions peuvent se présenter sous toute forme adaptée à l'administration par voie nasale comme des crèmes, des gels, de sprays, des poudres coatées ou non sur un support, etc....

Dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale de l'invention, le principe actif est un agent thérapeutique ou de diagnostic.

Comme précédemment, à titre, d'agent thérapeutique, on peut citer ceux choisis parmi : les analgésiques, anesthésiques, antalgiques, antispasmodiques, antiparkinsoniens, antiépileptiques, antimigraineux, ou tout autre agent utile dans le traitement des maladies neurodégénératives, psychiatriques ou du trouble du comportement, anticancéreux, antiviraux, antiprions, antibiotiques, ou encore des agents actifs comme des facteurs de croissance, des acides nucléiques, des vitamines, des hormones, etc....

A titre, d'agent de diagnostic, on peut citer ceux choisis parmi : les anticorps et molécules permettant de cibler des récepteurs du CNS, les agents d'imagerie médicale utilisés en IRM, scintigraphie, PET, ultrason.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent aussi comprendre un ou plusieurs agents perméabilisant la muqueuse nasale, du type de ceux définis précédemment.

L'invention concerne enfin un procédé de préparation d'une composition pharmaceutique décrite précédemment pour l'administration nasale d'un agent actif à délivrer au SNC, consistant à mélanger au moins un agent actif et une quantité inférieure et avantageusement très inférieure en poids par rapport à la quantité dudit principe

5

15

actif, de vitamine B12. On préfère plus particulièrement, dans le procédé de l'invention, mélanger le principe actif avec de l'ordre de 1 µg et 1 mg de vitamine B12.

10

5

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent concernant l'étude de l'effet antinociceptif de la morphine, du DAGO et de la buprénorphine administrés par voie nasale en présence de vitamine B12 sur un modèle souris, et se référant aux dessins en annexe dans lesquels :

15

10

- Les figures 1 et 2 illustrent la comparaison de l'effet antinociceptif obtenu par administration nasale de morphine seule (500 µg) et de morphine combinée à des doses croissantes de vitamine B12 (0,1-10 µg).

20

15

- Les figures 2 et 4 illustrent la comparaison de l'effet antinociceptif obtenu par administration nasale de DAGO seul (100 µg) et de DAGO en présence de 1 µg de vitamine B12.

25

20

- Les figures 5 et 6 illustrent la comparaison de l'effet antinociceptif obtenu par administration nasale de 8,5 µg de buprénorphine seule et de buprénorphine en présence de 1 µg de vitamine B12

30

#### 1) Produits utilisés.

25

- Morphine chlorhydrate : Francopia - France

35

- DAGO : E7384 Sigma - France

- Vitamine B12 ou cyanocobalamine : V2876 Sigma

- France

- Buprénorphine hydrochloride : Sigma B9275 -

40

30

France

- PBS 150 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>10mM, NaCl120mM, KCl

2.7mM) : Sigma - France

#### 2) Préparation des solutions.

45

35

- Préparation d'une solution de vitamine B12.

Vitamine B12 à 10 mg/ml : solubilisation de 10 mg de vitamine B12 dans 1 ml d'eau.

50

Vitamine B12 à 1 mg/ml : 100 µl de vitamine B12 à 10 mg/ml dans 900 µl d'eau.

55

Vitamine B12 à 0,2 mg/ml : 200 µl de vitamine B12 à 1 mg/ml dans 800 µl d'eau.

- Préparation d'une solution de Morphine.

Morphine à 60 mg/ml (Solution A): solubilisation de 60 mg de morphine dans 1 ml d'eau

- Préparation d'une solution de Buprénorphine.

Buprénorphine à 1 mg/ml : solubilisation de 1 mg de buprénorphine dans 1 ml d'eau. On vortexe bien.

3) Préparation des échantillons.

La préparation des échantillons est réalisée extemporanément, dans des tubes vénojects par ajout successif comme indiqué dans les tableaux I à IV ci-dessous:

Tableau I : Vitamine B12

Dose de vitamine B12	0,1 µg	1 µg	10 µg
Volume administration	10 µl	10 µl	10 µl
Vitamine B12	10 µl (à 0,2 g/l)	20 µl (à 1 g/l)	20 µl (à 10 g/l)
Eau	180 µl	180 µl	180 µl
Volume total	200 µl	200 µl	200 µl

Tableau II : Morphine en présence de vitamine B12

Dose de Morphine	500 µg	500 µg	500 µg
Dose de vitamine B12	0,1 µg	1 µg	10 µg
Volume administration	10 µl	10 µl	10 µl
Solution A	166,7 µl	166,7 µl	166,7 µl
Vitamine B12	10 µl (à 0,2 g/l)	20 µl (à 1 g/l)	20 µl (à 10 g/l)
Eau	23,3 µl	13,3 µl	13,3 µl
Volume total	200 µl	200 µl	200 µl

Tableau III : DAGO en présence de vitamine B12

Dose de DAGO	100 µg
Dose de vitamine B12	1 µg
Volume administration	10 µl
DAGO mg	1,6 mg
Vitamine B12	16 µl (à 1 g/l)
eau	128 µl
PBS 150 mM	16 µl
Volume total	160 µl

Tableau IV : Buprénorphine en présence de vitamine B12

Dose de buprénorphine	8,5 µg
Dose de vitamine B12	1 µg
Volume administration	10 µl
Voie administration	nasale
Buprénorphine à 1 mg/ml	170 µl
Vitamine B12 à 1 g/l	20 µl
eau	10 µl

## 4) Résultats.

## a) Mesure de l'activité antinociceptive (test d'Ameur &amp; Smith).

Les activités antinociceptives des différentes préparations ont été quantifiées comme étant l'augmentation du temps de latence du retrait de la queue de la souris soumise à une stimulation nociceptive (faisceau lumineux dirigé sur l'extrémité de la queue). Les temps de latence sont mesurés deux fois avant l'administration des formulations et à 15 mn, 30, 60, 90, 120, 240 minutes après administration. Chaque lot est composé de 10 souris Swiss mâles (souches Charles Rivers, USA) de 29-31 grammes. Un seuil maximum de 6 ou 8 secondes de stimulation est fixé pour empêcher la brûlure des tissus. Lorsque l'animal n'a toujours pas répondu à ce "cut-off", l'analgésie est considérée de 100 %.

Les temps de latence mesurés en secondes sont ramenés en % d'antinociception :

$\% \text{ antinociception} = 100 \times (\text{temps de latence} - \text{temps de base}) / (\text{cut off} - \text{temps de base})$

Un effet antinociceptif de 15 % est considéré comme minimal pour être pris en considération.

## b) Protocoles d'administration.

Pour une administration nasale (i.n.) 5 µl d'échantillon sont instillés à l'aide d'une pipette P20 dans chaque narine. Soit un volume total administré de 10 µl.

## c) Effet de la vitamine B12 seule.

La présence de 10 à 0.1 µg de vitamine B12 ne donne aucune activité antinociceptive par voie nasale.

5

d) Administration nasale de morphine (dose de 500 µg) en présence de vitamine B12.

Les résultats sont donnés sur la figure 1.

10

On constate que la présence de 1 µg ou 10 µg de vitamine B12 pour 500 µg de morphine permet d'améliorer l'activité antinociceptive de la morphine par voie nasale.

15

A 0,1 µg de vitamine B12 pour 500 µg de morphine, l'activité antinociceptive obtenue est semblable à celle obtenue avec la morphine seule.

10

e) Administration nasale de DAGO (dose de 100 µg) en présence de vitamine B12.

Les résultats sont donnés sur la figure 2.

20

15

La présence de 1 µg de vitamine B12 pour 100 µg de DAGO permet d'améliorer l'activité antinociceptive du peptide par voie nasale

25

f) Administration de buprénorphine (dose de 8,5 µg) en présence de vitamine B12.

Les résultats sont donnés sur la figure 3.

30

20

La présence de 1 µg de vitamine B12 pour 8,5 µg de buprénorphine permet d'améliorer l'activité antinociceptive du principe actif administré par voie nasale.

35

40

45

50

55

## Claims

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

19

## REVENDEICATIONS

10

5

1) Utilisation de vitamine B12 dans une composition pharmaceutique aqueuse administrée par voie nasale chez un sujet humain ou animal, pour obtenir et/ou augmenter le passage d'un agent actif présent dans ladite composition au niveau du SNC.

15

10

2) utilisation selon la revendication 1 pour obtenir et/ou augmenter l'efficacité d'une substance pharmacologiquement active au niveau du SNC administrée par voie nasale.

20

15

25

3) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que la quantité de vitamine B12 dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale est, en poids, inférieure et avantageusement très inférieure à la quantité d'agent actif administrée par voie nasale.

20

30

25

4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que la quantité de vitamine B12 dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale est comprise entre 0,1 µg et 1 mg.

35

40

30

45

35

5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'agent actif est un agent thérapeutique, choisi notamment parmi : les analgésiques, anesthésiques, antalgiques, antispasmodiques, antiparkinsoniens, antiépileptiques, antimigraineux, ou tout autre agent utile dans le traitement des maladies neurodégénératives, psychiatriques ou du trouble du comportement, anticancéreux, antiviraux, antiprions, antibiotiques, ou encore des agents actifs comme des facteurs de croissance, des acides nucléiques, des vitamines, des hormones.

50

55

5

20

10

5

6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'agent actif est un agent de diagnostic, choisi notamment parmi : les anticorps et molécules permettant de cibler des récepteurs du CNS, les agents d'imagerie médicale utilisés en IRM, scintigraphie, PET et ultrason.

15

10

20

7) Composition pharmaceutique aqueuse pour l'administration nasale d'au moins un agent actif à délivrer au SNC, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un agent actif et de la vitamine B12, le(s)dit(s) agent(s) actif étant mélangé(s) à la vitamine B12 dans ladite composition.

15

25

20

8) Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace de vitamine B12 pour obtenir et/ou augmenter l'efficacité d'une substance pharmacologiquement active au niveau du SNC.

30

25

35

9) Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 8, caractérisée en ce que la quantité de vitamine B12 dans la composition pharmaceutique pour l'administration par voie nasale est comprise entre 0,1 µg et 1 mg.

40

30

10) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient en outre tout véhicule pharmaceutiquement compatible avec la vitamine B12 et/ou l'agent actif, ainsi que éventuellement un agent de perméabilisation de la muqueuse nasale.

45

35

50

11) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que l'agent actif est un agent thérapeutique, choisi notamment parmi : les analgésiques, anesthésiques, antalgiques, antispasmodiques, antiparkinsoniens, antiépileptiques, antimigraineux, ou tout autre agent utile dans le traitement

55

des maladies neurodégénératives, psychiatriques ou du trouble du comportement, anticancéreux, antiviraux, antiprions, antibiotiques, ou encore des agents actifs comme des facteurs de croissance, des acides nucléiques, des vitamines, des hormones.

12) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que l'agent actif est un agent de diagnostic, choisi notamment parmi : les anticorps et molécules permettant de cibler des récepteurs du CNS, les agents d'imagerie médicale utilisés en IRM, scintigraphie, PET et ultrason.

13) Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que l'on mélange l'agent actif et une quantité inférieure et avantageusement très inférieure, en poids, par rapport audit principe actif, de vitamine B12.

Fig 1

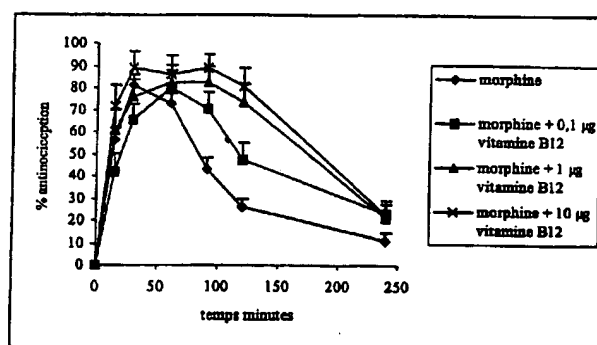


Fig 2

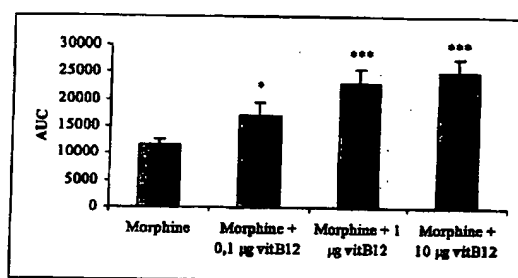


Fig 3

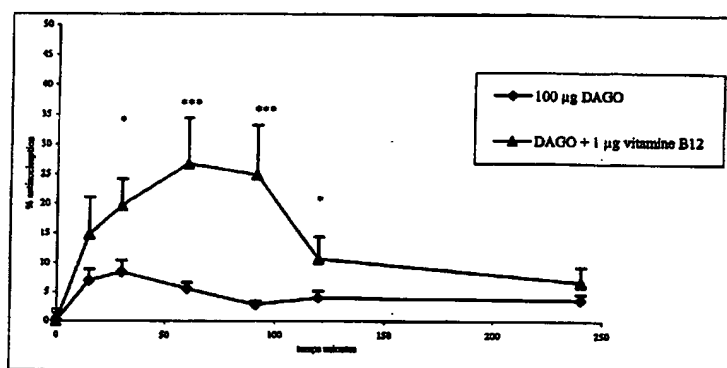


Fig 4

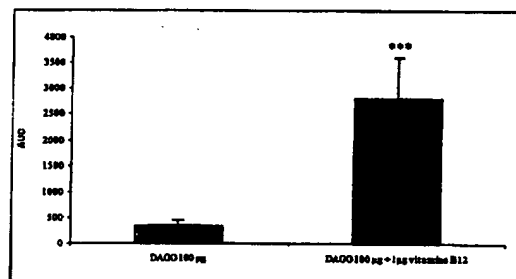
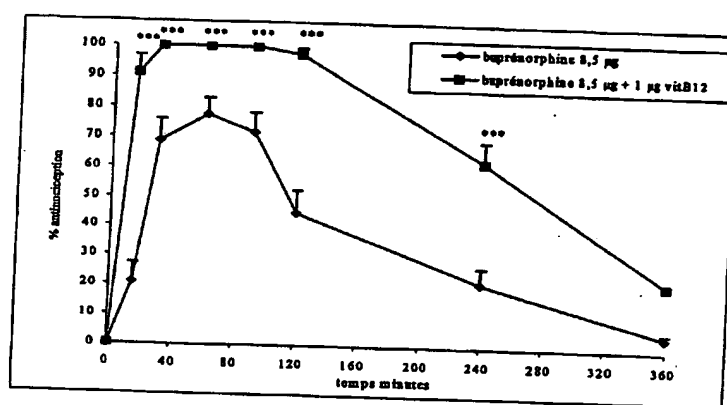
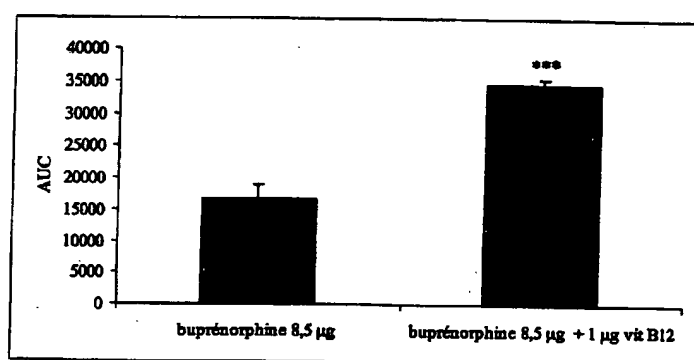


Fig 5



6/6

Fig 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 99/03060

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K9/00 A61K47/26 A61K47/24 A61K31/70 A61K31/485 A61K38/33 A61P25/04 //(A61K38/33,31:70),(A61K31/70,31:485)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 108 017 A (ROUSSEL UCLAF) 9 May 1984 (1984-05-09) cited in the application	7,8,10, 11
Y	claims 1-6	1,2,5,7, 8,10,11
A	page 2, line 10 - line 20 page 4, line 7 - line 23 example 1	13
Y	WO 93 15737 A (DANBIOSYST UK) 19 August 1993 (1993-08-19) claims 1,6	1,2,5,7, 8,10,11
A	EP 0 220 030 A (BIOTECH AUSTRALIA PTY LTD) 29 April 1987 (1987-04-29) claims 1,2,6,22,23,27	1,7,13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  10 March 2000		Date of mailing of the international search report  20/03/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6516 Patenlaan 2 NL - 2000 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Epskamp, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/03060

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 86 05988 A (NASTECH PHARM CO) 23 October 1986 (1986-10-23) cited in the application claims</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 99/03060

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0108017 A	09-05-1984	FR 2534809 A	27-04-1984
		AT 24111 T	15-12-1986
		AU 562828 B	18-06-1987
		AU 2060783 A	03-05-1984
		JP 5018811 B	15-03-1993
		JP 59116219 A	05-07-1984
		NZ 206048 A	13-12-1985
		US 4522816 A	11-06-1985
		ZA 8307972 A	28-11-1984
WO 9315737 A	19-08-1993	AT 171872 T	15-10-1998
		AU 3458093 A	03-09-1993
		CA 2127805 A	19-08-1993
		DE 69321458 D	12-11-1998
		DE 69321458 T	18-03-1999
		EP 0625044 A	23-11-1994
		ES 2123660 T	16-01-1999
		GB 2277682 A, B	09-11-1994
		JP 7503481 T	13-04-1995
		NO 942787 A	27-07-1994
		US 5629011 A	13-05-1997
EP 0220030 A	29-04-1987	AT 64534 T	15-07-1991
		AU 587658 B	24-08-1989
		AU 6528986 A	05-05-1987
		WO 8702251 A	23-04-1987
		CA 1330791 A	19-07-1994
		CN 1045391 B	06-10-1999
		DK 292587 A	09-06-1987
		ES 2051690 T	01-07-1994
		GR 3002160 T	30-12-1992
		HK 69094 A	22-07-1994
		IL 80264 A	21-11-1991
		IN 165029 A	05-08-1989
		JP 8000779 B	10-01-1996
		JP 63501015 T	14-04-1988
		KR 9403057 B	13-04-1994
		NZ 217821 A	27-07-1989
		SG 53294 G	14-10-1994
		US 5428023 A	27-06-1995
		US 5589463 A	31-12-1996
		ZA 8607703 A	24-06-1987
WO 8605988 A	23-10-1986	US 4724231 A	09-02-1988
		AT 54254 T	15-07-1990
		AU 584703 B	01-06-1989
		AU 5775786 A	05-11-1986
		CA 1300014 A	05-05-1992
		DK 603886 A	15-12-1986
		EP 0216917 A	08-04-1987
		HU 43493 A	30-11-1987
		IE 58533 B	06-10-1993
		JP 6069952 B	07-09-1994
		JP 62500789 T	02-04-1987
		NO 174182 B	20-12-1988
		ZA 8602845 A	29-10-1986
		ES 553999 D	01-11-1987
		OA 8486 A	29-07-1988

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

On le internationale No

PCT/FR 99/03060

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 A61K9/00 A61K47/26 A61K47/24 A61K31/70 A61K31/485 A61K38/33 A61P25/04 //(A61K38/33,31:70),(A61K31/70,31:485)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 108 017 A (ROUSSEL UCLAF) 9 mai 1984 (1984-05-09) cité dans la demande	7,8,10, 11
Y	revendications 1-6	1,2,5,7, 8,10,11
A	page 2, ligne 10 - ligne 20 page 4, ligne 7 - ligne 23 exemple 1	13
Y	WO 93 15737 A (DANBIOSYST UK) 19 août 1993 (1993-08-19) revendications 1,6	1,2,5,7, 8,10,11
A	EP 0 220 030 A (BIOTECH AUSTRALIA PTY LTD) 29 avril 1987 (1987-04-29) revendications 1,2,6,22,23,27	1,7,13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir le suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (note qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autre moyen "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et s'appliquant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'inven son revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'inven son revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 10 mars 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 20/03/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5518 Patentsan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-6040, Tx. 31 051 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Epskamp, S

Formulaire PCT/IBA/210 (dernière édition) (juillet 1998)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la recherche internationale No  
PCT/FR 99/03060

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 86 05988 A (NASTECH PHARM CO) 23 octobre 1986 (1986-10-23) cité dans la demande revendications</p>	

# **RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Don n° Internationale No

PCT/FR 99/03060

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0108017 A	09-05-1984	FR 2534809 A	27-04-1984
		AT 24111 T	15-12-1986
		AU 562828 B	18-06-1987
		AU 2060783 A	03-05-1984
		JP 5018811 B	15-03-1993
		JP 59116219 A	05-07-1984
		NZ 206048 A	13-12-1985
		US 4522816 A	11-06-1985
		ZA 8307972 A	28-11-1984
WO 9315737 A	19-08-1993	AT 171872 T	15-10-1998
		AU 3458093 A	03-09-1993
		CA 2127805 A	19-08-1993
		DE 69321458 D	12-11-1998
		DE 69321458 T	18-03-1999
		EP 0625044 A	23-11-1994
		ES 2123660 T	16-01-1999
		GB 2277682 A, B	09-11-1994
		JP 7503481 T	13-04-1995
		NO 942787 A	27-07-1994
		US 5629011 A	13-05-1997
EP 0220030 A	29-04-1987	AT 64534 T	15-07-1991
		AU 587658 B	24-08-1989
		AU 6528986 A	05-05-1987
		WO 8702251 A	23-04-1987
		CA 1330791 A	19-07-1984
		CN 1045391 B	06-10-1999
		DK 292587 A	09-06-1987
		ES 2051690 T	01-07-1994
		GR 3002160 T	30-12-1992
		HK 69094 A	22-07-1994
		IL 80264 A	21-11-1991
		IN 165029 A	05-08-1989
		JP 8000779 B	10-01-1996
		JP 63501015 T	14-04-1988
		KR 9403057 B	13-04-1994
		NZ 217821 A	27-07-1989
		SE 53294 G	14-10-1994
		US 5428023 A	27-06-1995
		US 5589463 A	31-12-1996
		ZA 8607703 A	24-06-1987
WO 8605988 A	23-10-1986	US 4724231 A	09-02-1988
		AT 54254 T	15-07-1990
		AU 584703 B	01-06-1989
		AU 5775786 A	05-11-1986
		CA 1300014 A	05-05-1992
		DK 603886 A	15-12-1986
		EP 0216917 A	08-04-1987
		HU 43493 A	30-11-1987
		IE 58533 B	06-10-1993
		JP 6069952 B	07-09-1994
		JP 62500789 T	02-04-1987
		NO 174182 B	20-12-1988
		ZA 8602845 A	29-10-1986
		ES 553999 D	01-11-1987
		OA 8486 A	29-07-1988

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**